

公益財団法人 南北海道学術振興財団 令和5年度研究助成金 成果報告書

助成事業の名称 : 膜方向性制御を活用した新規光電応答素子開発に係る研究事業

研究代表者 : 函館工業高等専門学校 一般系 准教授 横山泰範

1. 研究の概要と目的

生命の分子機械=タンパク質の工業応用は、その高効率の機能性と低環境負荷の性質が両立することから強く期待されている。光の入力に対し電気信号で応答する興味深い光機能性膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) を将来的に光電応答素子として活用するためには生体疑似環境での固体化法の確立が必須となる。本研究では、親水性高分子が形成するハイドロゲルで固体化した紫膜 (bR が集合した膜構造体) 中の bR 機能・構造を評価し、光電応答素子への応用のために必要となる膜方向性制御に対する塩添加の効果を検討した。

2. 研究内容

本研究事業の実施期間1年間において、以下に示す2つの実験を行った。(1) 親水性高分子ポリビニルアルコール (PVA) ハイドロゲルで固体化した紫膜試料中の bR の機能・構造評価。(2) 紫膜/PVA 固体化試料中の紫膜積層に対する添加塩の価数・濃度の影響の検討。

3. 結果と考察

(1) 親水性高分子 PVA ハイドロゲルで固体化した紫膜 bR の機能・構造評価

PVA 凍結融解 (FT) 法で固体化した bR の機能評価を、群馬大学・園山正史教授研究室所有のフラッシュフォトリス装置を用いて、光励起後の色素レチナールの吸収変化の時間分解測定により行った。結果として、PVA ハイドロゲル中においても溶液中 bR と同等の機能性を維持していることを確認した。構造評価については、タンパク質の構造評価に頻繁に用いられる円二色性 (CD) 分光スペクトル測定により行った。タンパク質の2次構造 (α -ヘリックス構造, β -シート構造) の情報が得られる遠紫外領域の CD スペクトル (図1) からは、ゲル構造形成過程 (FT0 \rightarrow FT4) で起こるハイドロゲル試料の変形の影響がベースラインの変動として見られたものの、 α -ヘリックス構造の特徴 (190 nm 付近の正の大きな CD ピークと 207 nm, 222 nm 付近の負の CD ピーク) が PVA と混合した直後 (FT0) だけでなく、凍結融解を繰り返しゲル化させる過程 (FT2, FT4) においても維持されていることが分かった。この結果は、bR 分子の大部分

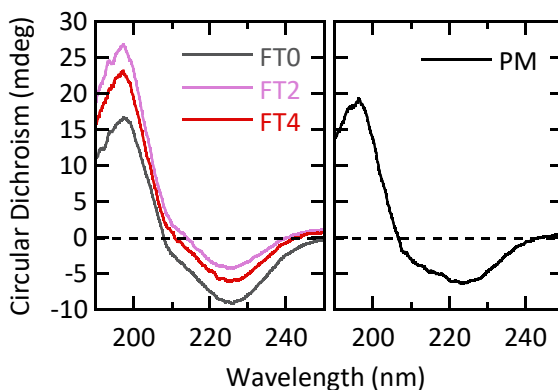


図1. PVA ゲル (左), 溶液中 (右) の紫膜 bR の遠紫外 CD スペクトル. FT は凍結融解サイクル数を表す.

が埋没する紫膜ごと PVA 中で固体化しているため、膜貫通領域内の膜貫通 α -ヘリックス構造には固体化の影響が及ばなかったことが原因として考えられる。今回この他に、ゲル化に伴って生ずる紫膜の積層構造について可視領域の CD スペクトル測定により確認した。紫膜が試料中非積層でランダム配向している場合、観測される可視 CD スペクトルは 530 nm の正の CD バンドと 600 nm の負の CD バンドからなる二相性の特徴を有する (図 2 非積層)。一方紫膜が積層するとこの CD バンドが正の CD バンドに変化することが知られている (図 2 積層)。今回観測した PVA 固体化試料においても紫膜の積層を確認した。

(2) 紫膜/PVA 固体化試料中の紫膜積層に対する添加塩の価数・濃度の影響の検討

紫膜積層構造形成と紫膜間の静電相互作用の関係を明らかにするために、PVA による紫膜固体化の際に価数の異なる塩 (NaCl; 1 価, CaCl₂; 2 価) を添加し、静電遮蔽により紫膜の積層化が阻害される塩濃度領域について調べた。NaCl, CaCl₂ いずれについても、添加量の増加に伴い可視 CD スペクトルの変化は小さくなり、ある濃度条件以上ではスペクトル変化は観測されなくなった。この結果は、紫膜間の静電相互作用が塩添加で遮蔽されることと、紫膜積層構造形成との関係を強く示すものである。添加する塩濃度により変化する静電相互作用が及ぶ距離 (デバイの長さ) については、帯電表面における電位勾配を記述する Debye-Huckel の式において、電位の減衰を特徴づける κ^{-1} として以下のように表される:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 k_B T}{\sum_i \rho_i e^2 z_i^2}} = \frac{0.304}{\sqrt{[\text{NaCl}]}} = \frac{0.176}{\sqrt{[\text{CaCl}_2]}} \quad (\text{at } 25^\circ\text{C}) \quad (1)$$

この式を用いて、今回実験で用いた塩濃度条件をデバイの長さに換算し、可視 CD スペクトルの変化量 $\Delta\text{CD}_{600\text{nm}}$ に対してプロットした図を図 3 に示す。図 3 は、添加した塩の価数に依らず、換算したデバイの長さから由来する可視 CD の変化量との良好な関係を示す。つまり今回の結果は、紫膜間に働く静電相互作用が紫膜積層に支配的に働くことを示す。現時点では可視 CD の変化からどの程度積層しているかを見積もることができていない。今後は積層構造の定量評価を行い、紫膜積層構造形成メカニズムについて更なる検討を進め、膜方向性制御に繋げる。

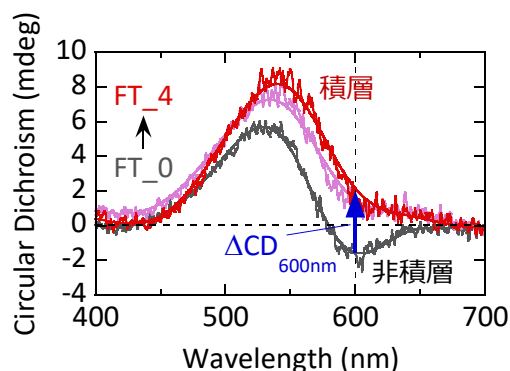


図 2. PVA 中の bR の可視 CD スペクトル. PVA 混合直後 (FT0) では紫膜は非積層だが、FT サイクルを経てゲル化し紫膜は積層する. [NaCl] = 5 mM, [bR] = 250 μ M.

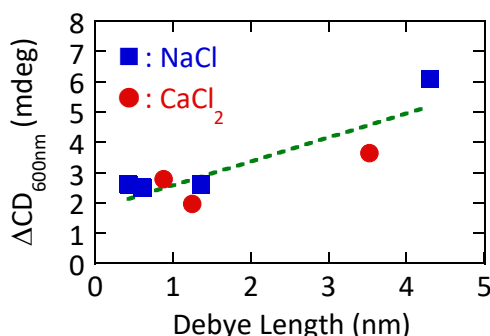


図 3. 紫膜積層化と静電遮蔽のデバイ長との関係. 添加した塩の価数に依らず静電相互作用の及ぶ距離 (デバイの長さ) と紫膜積層化の良好な関係が示された。